

OPTIMASI *MELTING TEMPERATURE* PRIMER DEGENERATE PADA SUHU 60°C GEN *ERM(T)* (*ERYTHROMYCIN RIBOSOME METHYLASE*) YANG RESISTENSI TERHADAP BAKTERI *Streptococcus pyogenes*

Karina Mawarnursavira¹, Rafika Sari², Pratiwi Apridamayanti³
Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura, Pontianak
karinamawar21@gmail.com

ABSTRAK

Resistensi eritromisin ditandai dengan adanya gen *erm(T)* yang mengkode terjadinya resistensi. Gen ini terletak di plasmid bakteri *Streptococcus pyogenes*. Gen *erm(T)* menyebabkan terbentuknya enzim metilase yang akan memodifikasi adenin pada 23S rRNA, sehingga obat sulit berikatan dengan subunit ribosom 50S bakteri. Pendeteksian resistensi dapat dilakukan dengan metode PCR yang membutuhkan primer dengan spesifitas tinggi sebagai bahan utama. Optimasi *melting temperature* pada desain primer bertujuan untuk mendapatkan primer dengan spesifitas yang tinggi. Metode yang digunakan yaitu kajian molekuler secara *in silico* berbasis bioinformatika menggunakan NCBI untuk mengambil data nukleotida. Optimasi *melting temperature* dan perancangan primer dilakukan dengan menggunakan Prime3Plus. Data sekuensing dianalisis dengan menggunakan OligoAnalyzer 3.1 Primer dirancang berdasarkan data *GenBank*: NC_019252.1. Satu pasang primer terbaik didapatkan dari lima kandidat primer hasil optimasi pada suhu optimum 60°C. Susunan nukleotida primer *forward* yaitu 5'-ACCGCCATTGAAATAGATCC-3' dan primer *reverse* 5'-CGAGCTATT AACTCTAGGTTTTGG-3'. Amplikon pasangan primer terbaik yaitu 351bp. Primer *forward* memiliki panjang basa 20bp, nilai T_m 60,1°C, % GC sebesar 45 % , *hairpin* dengan nilai $\Delta G = 0,63$ kcal/mol, *self dimer* dengan nilai $\Delta G = -4.62$ dan primer *reverse* dengan panjang 24 bp, T_m 60,9 °C, % GC sebesar 41,7 % , *hairpin* dengan nilai $\Delta G = -1,4$ kcal/mol, *self dimer* dengan nilai $\Delta G = -6.34$ serta *cross dimer* dengan $\Delta G = -5,98$ kcal/mol. Pasangan primer terbaik terdapat pada kandidat primer kedua dengan *melting temperature* optimum 60°C.

Kata Kunci : *Melting temperature*, gen *erm(T)*, *Streptococcus pyogenes*, desain primer

OPTIMAZATION OF DEGENERATE PRIMER MELTING TEMPERATURE IN 60°C GEN ERM(T) (*ERYTHROMYCIN RIBOSOME METHYLASE*) WHICH RESISTANCE TO *Streptococcus pyogenes* BACTERIA

Karina Mawarnursavira¹, Rafika Sari², Pratiwi Apridamayanti³
Pharmacy Study Program, Medical Faculty, Tanjungpura University, Pontianak
karinamawar21@gmail.com

ABSTRACT

Erythromycin resistance is characterized by presence of the *erm* (T) gene which codes for resistance. The gene located in plasmid of *Streptococcus pyogenes* bacteria. The *erm*(T) gene causes the formation of the methylase enzyme which modifies adenine in 23S rRNA, with the result of that the drug difficult to bind with 50S bacteria ribosome subunit. Resistance detection can be conducted by PCR method which use high specificity primer as main material. The optimization of *melting temperature* to primer design has purpose obtaining the primer with high specificity. The method which used is molecular studies of *in silico* based on bioinformatics using NCBI to extract nucleotide data. The optimization of *melting temperature* and primer design conducted with Prime3Plus. Sequencing data was analyzed by OligoAnalyzer 3.1 Primer designed based on *GenBank* data : NC_019252.1. The best one pair primer obtained from five primer candidates result of optimization at 60°C optimum temperature. The nucleotide primer *forward* structure are 5'-ACCGCCATTGAAATAGATCC-3' and primer *reverse* 5'-CGAGCTATTAACTCTAGGTTTTGG-3'. The best amplicon pair primer is 351bp. Primer *forward* has base length of 20bp, T_m value of 60,1°C, % GC of 45 % , *hairpin* with ΔG value = 0,63 kcal/mol, self dimer with ΔG value = -4.62 and primer reverse length of 24 bp, T_m 60,9 °C, % GC of 41,7 % , *hairpin* with ΔG value = -1,4 kcal/mol, self dimer with ΔG value = -6.34, also cross dimer with ΔG value = - 5,98 kcal/mol. The best primer pair is 2nd primer candidate with *melting temperature* optimum of 60°C.

Keyword : *Melting temperature*, *erm*(T) gene, *Streptococcus pyogenes*, primer design

PENDAHULUAN

Antibiotik merupakan suatu senyawa obat yang digunakan sebagai pengobatan utama dalam penatalaksanaan penyakit infeksi karena memiliki kemampuan untuk membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri.^(1,2) Peresepan antibiotik di Indonesia sebanyak 40 - 62% dinyatakan tidak tepat indikasi antara lain untuk penyakit-penyakit yang sebenarnya tidak membutuhkan terapi antibiotik. Penggunaan antibiotik dengan intensitas yang relatif tinggi dan tanpa pengawasan dapat menimbulkan permasalahan bagi kesehatan terutama timbulnya resistensi bakteri terhadap antibiotik. Eritromisin merupakan antibiotik golongan makrolida yang digunakan sebagai pengobatan untuk pasien yang hipersensitivitas terhadap penisilin pada infeksi bakteri *Streptococcus pyogenes*. Eritromisin bekerja dengan memodifikasi atau menghambat terjadinya sintesis protein dengan cara berikatan dengan subunit 50s ribosom bakteri, sehingga menghambat translokasi peptida.⁽³⁾

Eritromisin memberikan efek resistensi terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes* yang merupakan bakteri patogen berbahaya karena dapat memproduksi serangkaian toksin berupa eritrogenik toksin dan *pyogenic exotoxins* yang

memicu terjadinya ruam kemerahan. Infeksi bakteri *Streptococcus pyogenes* dapat menimbulkan beberapa penyakit berupa demam scarlet, pyoderma, faringitis, *rheumatic fever*, impetigo serta dapat menghancurkan jaringan lemak dan otot.⁽⁴⁻⁶⁾

Resistensi terhadap eritromisin diperantari oleh enzim yang terletak pada plasmid disebut *erythromycin ribosome methylase* (ERM). Gen ini akan menyebabkan terjadinya modifikasi target yang dimediasi oleh enzim metilase. Enzim metilase akan memodifikasi adenine pada 23S rRNA akibatnya obat akan sulit untuk berikatan dengan 50S ribosom subunit sehingga menyebabkan terjadinya resistensi. Gen resistensi dominan dan spesifik yang mengkode terjadinya resistensi eritromisin pada bakteri *Streptococcus pyogenes* adalah *erm(T)*.⁽⁷⁾

Diagnosis tepat mengenai kejadian resistensi yang terjadi pada pasien dengan infeksi bakteri *Streptococcus pyogenes* penting untuk dilakukan dan harus menjadi hal utama agar terapi yang diberikan menjadi rasional dan tepat sasaran. Pendeteksian kejadian resistensi dapat dilakukan dengan metode PCR yang memerlukan primer berupa sederet sekuens DNA pendek sebagai pengenalan DNA target. Desain primer spesifik dapat dibuat dengan menggunakan konstruksi

secara *in silico* dengan melakukan optimasi *melting temperature* yang berbasis bioinformatika. Optimasi *melting temperature* yang dilakukan *in silico* merupakan salah satu metode uji pendahuluan yang efektif, mudah dan efisien untuk merancang suatu primer yang spesifik. Berdasarkan uraian di atas, adanya gen *erm(T)* pada bakteri *Streptococcus pyogenes* yang merupakan penyebab terjadinya resistensi dimanfaatkan untuk perancangan primer secara *in silico*.⁽⁸⁾

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini adalah penelitian berbasis kajian biologi molekuler yang dilakukan secara *in silico*. Bahan yang diperlukan berupa sekuens nukleotida dari sampel gen *erm(T)* *Streptococcus pyogenes* yang didapat dari situs *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*. Perancangan kandidat primer serta optimasi *melting temperature* dilakukan dengan menggunakan *Primer3Plus* dan analisis kriteria primer dengan menggunakan *OligoAnalyzer 3.1*.

Pencarian Sekuens Nukleotida dengan NCBI

Penelitian ini diawali dengan pencarian data sekuens nukleotida gen *erm(T)* dari bakteri *Streptococcus pyogenes* melalui NCBI menggunakan penelusuran menu

“*Gene*” dengan kata kunci yaitu *erm(T)* *Streptococcus pyogenes*. Perlu diperhatikan bahwa akan muncul banyak hasil dari pencarian sekuens nukleotida, sehingga pada bagian “*Gene ID*” harus memuat kode gen yang sama yaitu *erm(T)* serta pada bagian “*Description*” memuat organisme yang diinginkan yaitu *Streptococcus pyogenes*. Pilih menu “*GenBank*” setelah didapatkan data mengenai keberadaan gen *erm(T)* pada *Streptococcus pyogenes* untuk melihat sekuens nukleotida yang dihasilkan.

Pencarian Kandidat dan Optimasi *Melting Temperature* Primer dengan *Primer3Plus*

Sekuens nukleotida yang telah didapatkan, dicopy bagian “*FASTA*” dan dianalisis pemilihan kandidat primer *forward* dan *reverse* dengan menggunakan program *Primer3Plus*. Hasil yang akan didapatkan yaitu beberapa kandidat primer *forward* dan *reverse* dengan susunan basa nukleotida yang berbeda-beda.

Analisis Primer *Forward* dan *Reverse* dengan *OligoAnalyzer 3.1*

Hasil kandidat primer yang diperoleh kemudian dianalisa dengan mempertimbangkan kriteria primer di dalam program *Integrated DNA Technologies* (IDT) *OligoAnalyzer 3.1* dengan menempelkan urutan primer ke

dalam kotak urutan dan klik pada kotak *Analyze*, Hairpin: Submit dan *Self-Dimer* di sebelah kanan.

ANALISIS DATA

Analisis struktur sekunder kandidat primer dilakukan dengan menggunakan perangkat *OligoAnalyzer 3.1*. Perangkat ini menampilkan sifat-sifat seperti nilai *hairpin*, %GC, panjang basa, *melting temperature* (T_m), *self dimer* dan *cross dimer*. Data yang dihasilkan merupakan data yang bersifat kualitatif, sehingga hanya dilakukan analisis deskriptif.

HASIL DAN DISKUSI

Pencarian Sekuen Nukleotida Gen Erm(T) pada bakteri *Streptococcus pyogenes* dengan Menggunakan National Center for Biotechnology Information (NCBI)

Pencarian sekuen nukleotida gen erm(T) bakteri *Streptococcus pyogenes* didapatkan melalui situs NCBI pada menu GenBank. Sekuen nukleotida yang digunakan dalam penelitian ini merupakan data urutan basa nukleotida yang mengandung gen erm(T) pada bakteri *Streptococcus pyogenes*. Sekuen nukleotida yang mengandung gen erm(T) didapatkan dari menu pencarian *RefSeqGene* pada alamat situs <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/rsg>. *RefSeqGene* merupakan salah satu menu

dalam NCBI yang menawarkan kemudahan dalam mencari informasi genetik berupa asam amino, nukleotida, jumlah panjang basa dan jurnal-jurnal terkait mengenai gen yang diinginkan. Urutan *RefSeqGene* yang diinginkan dapat dicari dan diambil dari database *Gene* dan *Nucleotide*. Pemilihan sekuen nukleotida melalui situs NCBI dilakukan dengan menggunakan kata kunci “erm(T), *Streptococcus pyogenes*” sehingga didapatkan hasil yang spesifik mengenai gen resistensi berupa erm(T) yang terdapat dalam bakteri *Streptococcus pyogenes*.

Hasil pencarian melalui NCBI diidentifikasi terlebih dahulu pada bagian *Summary* yang berisi rincian singkat mengenai identitas gen yang telah didapatkan. Hal ini bertujuan untuk memastikan bahwa gen yang didapat sesuai dengan gen yang akan digunakan pada perancangan primer yaitu gen erm(T) *Streptococcus pyogenes*. Gen spesifik dari erm(T) *Streptococcus pyogenes* dapat diakses pada alamat *website* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/13917802> dengan kode identitas gen 13917802 yang di update pada tanggal 27 Agustus 2016.

Berdasarkan hasil *summary* data gen erm(T) *Streptococcus pyogenes* (**Gambar 1**), gen ini memiliki simbol “erm(T)” dengan deskripsi gen *methylase*.

erm(T) methylase [*Streptococcus pyogenes*]

Gene ID: 13917802, updated on 27-Aug-2016

Summary

Gene symbol	erm(T)
Gene description	methylase
Locus tag	D684_p2
Gene type	protein coding
RefSeq status	PROVISIONAL
Organism	Streptococcus pyogenes (strain: GA2000)
Lineage	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Streptococcaceae; Streptococcus

Gambar 1. Summary gen erm(T) *Streptococcus pyogenes*

Methylase merupakan suatu senyawa yang menyandi terjadinya resistensi eritromisin pada *Streptococcus pyogenes*. *Methylase* yang di produksi akibat adanya gen erm(T) menyebabkan resistensi dengan memodifikasi tempat eritromisin berikatan di ribosom 50S.⁽⁹⁻¹¹⁾ *Locus tag* menandakan letak keberadaan gen erm(T) dalam suatu kromosom. Gen erm(T) pada *Streptococcus pyogenes* terletak pada lokus D684_p2 dalam berkas kromosom. Lokus tersebut berisikan gen yang berfungsi sebagai protein pengkode dengan status referensi sekuen yaitu provisional yang sewaktu-waktu dapat diperbaharui oleh penelitian.⁽¹²⁾

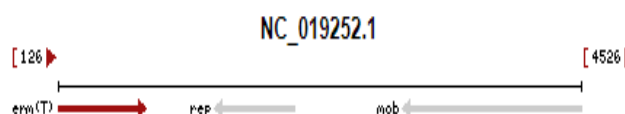
Organisme yang teridentifikasi sesuai dengan organisme

Location: plasmid: pGA2000

Sequence: NC_019252.1 (126..860)

yang diinginkan yaitu *Streptococcus pyogenes* pada strain GA 2000, dengan garis silsilah yaitu *Bacteria*; *Firmicutes*; *Bacilli*; *Lactobacillales*; *Streptococcaceae*; *Streptococcus*. Informasi yang terdapat pada bagian *Summary* telah menandakan bahwa gen ini sesuai dengan gen yang diinginkan yaitu gen erm(T) yang terdapat dalam bakteri *Streptococcus pyogenes*.

Gen erm(T) *Streptococcus pyogenes* berada pada plasmid pGA2000 pada urutan basa 126 hingga 860 (**Gambar 2**) dengan total pasangan basa 735 bp. Sekuen nukleotida dari gen erm(T) *Streptococcus pyogenes* dapat diakses pada bagian *Genomic regions*, *transcripts*, and *products* berupa data *GenBank* ataupun data *FASTA*.



Gambar 2. Konteks Genomik Gen erm(T) *Streptococcus pyogenes*

Hasil identifikasi data sekuen nukleotida gen *erm(T)* bakteri *Streptococcus pyogenes* pada menu *GenBank* menunjukkan bahwa sekuen nukleotida terdiri dari 735 pasang basa dengan DNA jenis linear dengan *Coding DNA Sequences* (CDS) pada sekuen ini terletak pada seluruh basa nukleotida. *Coding DNA Sequences* (CDS) merupakan bagian sekuen DNA yang berperan penting dalam ekspresi gen untuk pembentukan protein yang didalamnya akan terdapat kodon start dan kodon stop. Kodon terdiri dari suatu triplet nukleotida yang akan mengkode asam amino tertentu pada proses sintesis protein. Wilayah CDS biasanya dimulai pada ujung 5' dengan kodon start berupa metionin (AUG) dan berakhir pada ujung 3' dengan kodon stop berupa UAG, UAA dan UGA. Kodon start merupakan kodon inisiator yang berfungsi sebagai tanda untuk dimulainya sintesis protein sedangkan kodon stop yang biasanya disebut sebagai kodon terminator merupakan suatu kodon yang berfungsi untuk mengakhiri suatu proses sintesis protein.⁽¹³⁾

Perancangan Kandidat Primer dan Optimasi *Melting Temperature* dengan Menggunakan *Primer3Plus*

Perancangan kandidat primer dilakukan dengan menggunakan sekuen nukleotida yang telah didapatkan dari

NCBI khususnya pada bagian *FASTA*. Analisa kandidat primer dari sekuen nukleotida ini dilakukan dengan membuka situs <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi> dan masuk pada menu *Primer3Plus*. Keunggulan dari penggunaan *Primer3Plus* dibandingkan situs lainnya yaitu akses yang mudah, tidak perlu dilakukan penginstalan hanya membutuhkan koneksi internet saja dan kemampuan pemilihan lokasi primer lebih spesifik dan tepat. *Primer3Plus* memiliki kapasitas tinggi untuk mendesain primer-primer yang mendekati sekuen target dan meminimalisir terjadinya amplifikasi pada bagian yang tidak diinginkan. Hal ini yang membuat *Primer3Plus* banyak digunakan oleh para peneliti.

Pencarian kandidat primer dilakukan dengan memperhatikan kriteria primer pada bagian *General Settings* khususnya pada *Primer Melting Temperature* (T_m). T_m yang digunakan yaitu pada suhu minimum 57°C, suhu optimum 60°C dan suhu maksimum 63°C. Primer yang didapatkan melalui *Primer3Plus* dengan T_m optimum 60°C sebanyak 5 kandidat primer dengan masing-masing 1 primer *forward* dan 1 primer *reverse*. Primer *forward* pada *Primer3Plus* dilambangkan dengan *Primer_F* dan primer *reverse* dilambangkan dengan *Primer_R*. Primer

forward merupakan primer yang berada di ujung depan DNA target dengan fungsi untuk menandai ujung depan untai DNA yang akan digandakan dengan kata lain primer *forward* akan bergerak dari ujung 5' menuju ujung 3', sedangkan primer *reverse* merupakan primer yang berada di ujung belakang DNA target dengan fungsi menandai ujung belakang untai DNA yang akan digandakan dan akan bergerak dari

ujung 3' menuju ujung 5'.⁽¹⁴⁾ Kandidat primer yang dihasilkan dari masing-masing T_m optimum memiliki panjang amplikon yang berbeda-beda dengan susunan nukleotida yang berbeda-beda pula. Amplikon merupakan untai DNA target yang berhasil digandakan pada saat proses PCR (*Polymerase Chain Reaction*) berlangsung.

Tabel 1. Hasil Pencarian Kandidat Primer dengan Primer3Plus pada *Melting Temperature* (T_m) 60°C

Kandidat Primer	Primer <i>Forward</i>	Primer <i>Reverse</i>	Panjang Amplikon
Primer 1	CCGCCATTGAAATAGATCCT	CTTTCTGTAGCTGTGCTTTCAA	202 bp
Primer 2	ACCGCCATTGAAATAGATCC	CGAGCTATTAAGTCTAGGTTTGG	351 bp
Primer 3	AACCGCCATTGAAATAGATCC	CTTTCTGTAGCTGTGCTTTCAA	204 bp
Primer 4	ACCGCCATTGAAATAGATCCT	CTTTCTGTAGCTGTGCTTTCAA	203 bp
Primer 5	CCGCCATTGAAATAGATCCT	ACTTTCTGTAGCTGTGCTTTCA	203 bp

Panjang amplikon dari masing-masing primer menandakan jumlah basa produk yang dihasilkan oleh primer tersebut ketika terjadi proses amplifikasi dengan menggunakan PCR. Panjang amplikon dari amplifikasi dengan menggunakan primer bergantung dengan tujuan penelitian yang akan dilakukan. Panjang amplikon standar PCR yaitu 100-500 bp sedangkan untuk panjang amplikon qPCR (quantitative-PCR) yang baik yaitu dalam rentang 80-200 bp. Produk dengan

panjang 2000 memerlukan waktu 1 menit untuk proses *extention* pada tahap PCR.⁽¹⁵⁾ Berdasarkan data amplikon yang dihasilkan dari masing-masing kandidat primer menunjukkan bahwa waktu yang diperlukan untuk proses *extention* pada PCR yaitu kurang dari 1 menit.

Hasil Analisis

Hasil analisis kriteria primer dari gen *erm(T)* *Streptococcus pyogenes* yang meliputi panjang basa, T_m, % GC, *hairpin*, *self dimer* dan *cross dimer*

menunjukkan bahwa kandidat primer kedua pada T_m optimum 60°C telah memenuhi seluruh kriteria primer, sehingga dapat dikatakan sebagai primer yang terbaik. Primer *forward* pada kandidat primer kedua memiliki panjang basa sebesar 20bp dengan sekuens nukleotida yaitu 5'ACCGCCATTGAAATAGATCC'3, sedangkan untuk primer *reverse* memiliki panjang basa sebesar 24bp dengan sekuens nukleotida 5'CGAGCTATTA ACTCTAGGTTTGG'3.

Amoozegar (2014) menyatakan bahwa primer dengan panjang basa 18-28

bp merupakan primer yang menghasilkan amplifikasi terbaik. Pendapat lain dikemukakan oleh Maksu pada tahun 2017, primer yang baik memiliki panjang basa 18-20 bp karena semakin panjang suatu basa tidak akan menyebabkan bertambahnya spesifitas dari suatu primer.⁽¹⁶⁾ Kandidat primer kedua memiliki panjang basa pada primer *forward* sebesar 20 bp dan pada primer *reverse* sebesar 24 bp yang menandakan bahwa kandidat primer pertama memenuhi kriteria serta memiliki spesifitas yang tinggi.

Tabel 2. Primer dengan Kriteria Primer yang Terbaik dari Gen *erm(T)* *Streptococcus pyogenes*

No	Primer	Panjang Basa	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	% GC (%)	Hairpin (kcal/mol)	Self Dimer (kcal/mol)	Cross Dimer (kcal/mol)
1	Erm(T)-pF	20 bp	59,9	45	0,63	-4,62	-9,36
	Erm(T)-pR	22 bp	61,3	40,9	-1,2	-6,34	
2	Erm(T)-pF	20 bp	60,1	45	0,63	-4,62	-5,98
	Erm(T)-pR	24 bp	60,9	41,7	-1,4	-6,34	
3	Erm(T)-pF	21 bp	60,8	42,9	0,63	-4,62	-9,36
	Erm(T)-pR	22 bp	61,3	40,9	-1,2	-6,34	
4	Erm(T)-pF	21 bp	61,7	42,9	0,63	-4,62	-9,36
	Erm(T)-pR	22 bp	61,3	40,9	-1,2	-6,34	
5	Erm(T)-pF	20 bp	59,9	45	0,63	-4,62	-7,42
	Erm(T)-pR	22 bp	62,5	40,9	-0,3	-6,34	

Analisis nilai T_m kandidat primer pertama diperoleh nilai T_m sebesar $60,1^{\circ}\text{C}$

untuk primer *forward* dan $60,9^{\circ}\text{C}$ untuk primer *reverse* dengan nilai selisih antara

primer *forward* dan *reverse* sebesar 0,8. Nilai T_m yang optimal menurut Borah (2011) untuk sebuah primer berada pada rentang $52-58^{\circ}\text{C}$.⁽¹⁷⁾ Pasangan suatu primer yang baik memiliki selisih nilai T_m yang tidak lebih dari 5.⁽¹⁸⁾ Hal ini menandakan bahwa kandidat primer pertama telah memenuhi kriteria primer karena nilai T_m yang didapatkan berada pada rentang T_m yang optimal serta memiliki nilai ΔT_m yang lebih kecil.

%GC yang diperoleh untuk kandidat primer pertama yaitu 45% untuk primer *forward* dan 41,7% untuk primer *reverse*. %GC untuk suatu primer yang baik berada pada rentang 40-60%.⁽¹⁷⁾ Primer dengan %GC dibawah 50% membutuhkan panjang basa lebih dari 18bp untuk menjaga agar T_m tetap berada diatas batas minimum yang disarankan. Kandidat primer kedua telah memenuhi kriteria primer dari %GC karena berada pada rentang 40-60%. Walaupun %GC yang diperoleh cukup kecil karena berada dibawah 50%, namun %GC ini masih berada didalam rentang kriteria primer serta kandidat primer pertama memiliki panjang basa lebih dari 18bp sehingga kandidat primer pertama masih dapat digunakan untuk proses PCR. Hal ini diperkuat berdasarkan hasil penelitian Budiani (2009), bahwa % GC yang berada dibawah 50% ternyata masih dapat berfungsi dengan baik dalam proses PCR

dan dapat menghasilkan fragmen DNA yang spesifik.⁽¹⁹⁾

Nilai ΔG yang diperoleh kandidat primer kedua pada kriteria hairpin yaitu sebesar 0,63 kcal/mol untuk primer *forward*, sedangkan untuk primer *reverse* sebesar -1,4 kcal/mol. Sasmito (2014) menyatakan bahwa, nilai ΔG yang diperlukan untuk memecah struktur *hairpin* yaitu lebih besar dari -3 kcal/mol.⁽¹⁸⁾ Hal ini menunjukkan bahwa kandidat primer kedua membentuk struktur hairpin namun struktur tersebut dapat dengan mudah dipecah karena memiliki nilai ΔG yang lebih besar dari -3 kcal/mol.

Nilai ΔG yang diperoleh kandidat primer pertama pada kriteria *self dimer* yaitu sebesar -4,62 kcal/mol untuk primer *forward* dan -6,34 kcal/mol untuk primer *reverse*, sedangkan pada kriteria *cross dimer* nilai ΔG yang didapatkan yaitu sebesar -5,98 kcal/mol. Menurut Sasmito (2014), nilai ΔG yang diperlukan untuk memecah struktur *self dimer* dan *cross dimer* yaitu lebih besar dari -6 kcal/mol.⁽¹⁸⁾ Kandidat primer kedua menunjukkan bahwa struktur *self dimer* dan *cross dimer* yang terbentuk dapat dipecah karena memiliki nilai ΔG yang lebih besar dari -6 kcal/mol. Primer *reverse* dari kandidat primer kedua seharusnya memiliki *self dimer* yang sulit untuk diputus karena memiliki nilai ΔG sebesar -6,34 kcal/mol,

namun hal ini dapat digunakan sebagai primer karena nilai ΔG yang didapat tidak berbeda jauh dari nilai ΔG yang diperlukan untuk memecah struktur *self dimer* yaitu -6 kcal/mol, sehingga primer ini masih dapat memecah struktur *self dimer* yang terbentuk.

KESIMPULAN

Primer terbaik dari hasil optimasi *melting temperature* pada suhu optimum 60°C gen *erm(T) Streptococcus pyogenes* terdapat pada kandidat primer kedua dengan susunan nukleotida 5'-ACCGCCATTGAAATAGATCC-'3 dan primer *reverse* 5'-CGAGCTATTAACTCTAGGTTTTGG - '3. Primer *forward* memiliki panjang basa 20bp, nilai T_m 60,1°C, % GC sebesar 45 % , *hairpin* dengan nilai ΔG = 0,63 kcal/mol, *self dimer* dengan nilai ΔG = -4.62 dan primer *reverse* dengan panjang 24 bp, T_m 60,9 °C, % GC sebesar 41,7 % , *hairpin* dengan nilai ΔG = -1,4 kcal/mol, *self dimer* dengan nilai ΔG = -6.34 serta *cross dimer* dengan ΔG = - 5,98 kcal/mol.

DAFTAR PUSTAKA

1. Tjay TH, Rahardja K. Obat-obat Penting. JAKARTA: PT Elex Media Komputindo; 2007. 55-56 p.
2. Indrawati I, Ratningsih N, Djajasupena S. Edisi Agustus 2013

Volume VII No. 2. Jur Kim FMIPA Unpad. 2013;VII(2):89–105.

3. Kesehatan M, Indonesia R. Menteri kesehatan republik indonesia. In: PERATURAN MENTERI KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA NOMOR 2406/MENKES/PER/XII/2011. Jakarta: Kementrian Kesehatan Republik Indonesia; 2011. p. 1–5.
4. Warda K, Oufdou K, Zahlane K, Bouskraoui M. Antibiotic resistance and serotype distribution of nasopharyngeal isolates of *Streptococcus pneumoniae* from children in Marrakech region (Morocco). J Infect Public Health [Internet]. King Saud Bin Abdulaziz University for Health Sciences; 2013;6(6):473–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2013.06.003>
5. Hugo W, Russel A. Pharmaceutical Microbiology. 6th Editio. United Kingdom: The Blackwell Science; 2000. 26 p.
6. Woodbury RL, Klammer KA, Xiong Y, Bailiff T, Glennen A, Bartkus JM, et al. Plasmid-Borne *erm (T)* from Invasive , Macrolide-Resistant *Streptococcus pyogenes* Strains □ . Am Soc Microbiol. 2008;52(3):1140–3.
7. Dipersio LP, Dipersio JR, Frey KC,

- Beach JA. Prevalence of the erm (T) Gene in Clinical Isolates of Erythromycin-Resistant Group D Streptococcus. *Am Soc Microbiol.* 2008;52(4):1567–9.
8. Tedi Suryadi P, Ratnayani K, Yowani SC. DESAIN PRIMER UNTUK AMPLIFIKASI GEN katG MULTIDRUG RESISTANCE TUBERCULOSIS (MDR-TB) DENGAN METODE POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR). *J Kim.* 2014;8(1):77–82.
 9. Setiabudi R. Antimikroba Lain: Farmakologi dan Terapi. 5th ed. Jakarta; 2007. 4-734 p.
 10. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Farmakologi Dasar dan Klinik. 12th ed. Jakarta: EGC; 2014.
 11. Kanzil T. UJI RESISTENSI BAKTERI BACILLUS SP YANG DIISOLASI DARI PLAK GIGI TERHADAP MERKURI DAN ERITROMISIN. 2015;3(April):1–4.
 12. Leary NAO, Wright MW, Brister JR, Ciufu S, Haddad D, Mcveigh R, et al. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status , taxonomic expansion , and functional annotation. 2016;44(November 2015):733–45.
 13. Muladno. Teknologi Rekayasa Genetika. 2nd ed. Bogor: IPB Press; 2010.
 14. Jusuf M. Genetika I: Struktur dan Ekspresi gen. 1st ed. Jakarta: Sagung Seto; 2001.
 15. Yusuf Z. Polymerase Chain Reaction (PCR). *Saintek.* 2010;5(6):1–6.
 16. Maksum IP, Amalia R, Kamara DS, Diana S, Rachman RW. PCR Multipleks untuk Identifikasi Mycobacterium tuberculosis Resisten terhadap Isoniazid dan Rifampisin pada Galur Lokal Balai Laboratorium Kesehatan Provinsi Jawa Barat Multiplex PCR for Identification the Isoniazid- and Rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis (Local Strain of Balai Laboratorium Kesehatan Provinsi Jawa Barat) 2018;4(Nov):107–18.
 17. Borah P. Primer Designing for PCR. *Sci Vis.* 2011;11(3):134–6.
 18. Sasmito D, Kurniawan R, Muhimmah I. Karakteristik primer pada polymerase chain reaction (PCR) untuk sekuensing DNA: mini review. *SNI Med.* 2014;5:93–102.
 19. Budiani A, Putranto RA, Santoso D. Kloning gen penyandi β -1 , 6-glukanase kapang secara cepat dengan teknik RT-PCR menggunakan primer spesifik. *Menara Perkeb.* 2009;77(1):45–57.